

Zellgehaltsbestimmung in Milch
nach dem Biolumineszenzverfahren

CLAUDIA BRUNNER

1979

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Lehrstuhl: Prof. Dr. M. Rüsse

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. K. Walser

Zellgehaltsbestimmung in Milch nach dem
Biolumineszenzverfahren.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Claudia Brunner

aus
München

München 1979

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.K.Walser
für die Überlassung des Themas und seine jederzeit
gewährte Anleitung und Unterstützung bei der Anfer-
tigung meiner Arbeit.



Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. K. Walser

Korreferent: Prof. Dr. G. Terplan

Tag der Promotion: 27. Juli 1979

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	3
2.1. Biolumineszenz	3
2.2. Anwendungsbeispiele	8
2.3. ATP - Messungen mit dem LUMAC ^R - System	12
3. Eigene Untersuchungen	14
3.1. Material und Methoden	14
3.2. Ergebnisse	16
3.2.1. Reaktionskinetik	16
3.2.2. Wiederholbarkeit der Meß- ergebnisse	21
3.2.3. Änderung der Meßergebnisse in Ab- hängigkeit von Zeit- und Lagerungs- temperatur der Milch	22
3.2.4. Messung der Lumineszenz verschie- dener ATP-Konzentrationen in Aqua dest.	24
3.2.5. Messung verschiedener ATP-Kon- zentrationen in Milch	26
3.2.6. Einfluß von Fett- und Eiweiß- gehalt einer Probe auf die Lumineszenz	30
3.2.7. Korrelationen zwischen Zellgehalt, Lichtemission und ATP-Gehalt ver- schiedener Milchproben	31
4. Besprechung der Ergebnisse	34
5. Zusammenfassung	43
6. Literaturverzeichnis	44
Anhang	49

1. Einleitung:

Es gibt verschiedene Methoden, den Zellgehalt einer Milchprobe zu bestimmen. Man unterscheidet dabei direkte und indirekte Verfahren.

Zu den direkten Verfahren gehören u. a. das Ausstrichverfahren nach PRESCOTT und BREED (1910), die elektronische Zellzählung mit dem Coulter - Counter (PHIPPS und NEWBOULD 1966; ZEIDLER, TOLLE und HEESCHEN 1968) und die Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (SCHMIDT MADSEN 1975).

Bei den indirekten Verfahren wird von chemischen Reaktionen auf den Zellgehalt einer Milchprobe geschlossen. So sind z. B. DNS-Gehalt (SCHALM 1960), Laktosegehalt (STAHLHUT - KLIPP 1973) und die Aktivität bestimmter Enzyme (KITCHEN 1976) mit dem Zellgehalt einer Milchprobe korreliert.

Ein weiteres indirektes Verfahren, um den Zellgehalt einer Milchprobe zu bestimmen, ist möglicherweise der ATP-Nachweis mit Hilfe der Biolumineszenz. Da ATP in allen tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Zellen vorkommt, liegt der Schluß nahe, daß zwischen ATP-Gehalt und Zellgehalt einer Probe ein Zusammenhang besteht. Bei der Messung des ATP-Gehaltes einer Probe durch Biolumineszenz handelt es sich um einen hochempfindlichen Nachweis kleiner ATP-Mengen, der in vielen Gebieten der Biologie und Medizin zunehmend eingesetzt wird. Inzwischen werden Apparate und Reaktionsansätze angeboten, die eine routinemäßige Bestimmung des ATP-Gehaltes ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen Zellgehalt und ATP-Gehalt einer Milchprobe besteht, und ob das Verfahren, so wie es im Handel angeboten wird, für den routinemäßigen Einsatz geeignet ist.

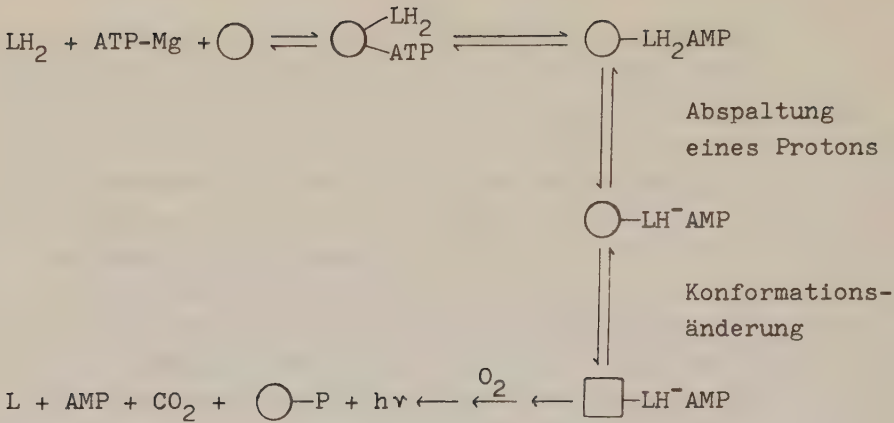
2. Literatur:

2. 1. Biolumineszenz:

Als Biolumineszenz bezeichnet man die Fähigkeit einiger Organismen chemische Energie in Lichtenergie umzuwandeln. Die durch eine Redoxreaktion freiwerdende Energie wird zur Anregung eines Moleküls genutzt, das dadurch in einen energiereichen Zustand versetzt wird. Wenn das Molekül in seinen Grundzustand zurückkehrt, wird die Anregungsenergie als sichtbares Licht emittiert. Die Fähigkeit der Biolumineszenz ist bei den Leuchtkäfern, zu denen das Glühwürmchen "Photinus pyralis" gehört, besonders hoch entwickelt.

1947 entdeckte Mc ELROY, daß wässrige Extrakte aus den Leuchtorganen dieser Leuchtkäfer nach Abklingen des Leuchtens erneut Licht emittieren, wenn man ATP zusetzt. In den auf diese Entdeckung folgenden Untersuchungen wurde der Mechanismus der Biolumineszenz geklärt. Aus den Leuchtorganen von Glühwürmchen wurden zwei Komponenten extrahiert, ein hitzestabiles heterocyclisches Phenol, das Luciferin und ein hitzelabiles Enzym, die Luciferase.

Reduziertes Luciferin reagiert mit ATP und Luciferase in Anwesenheit von Mg^{++} unter Bildung von Luciferyl-Adenylat. Im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion wird ein Proton abgespalten, und der Luciferase-Luciferyl-Adenylat-Komplex ändert seine Konformation. Dadurch kann er molekularen Sauerstoff binden, und es folgen die Reaktionen, die die Lichtemission bewirken. Jedes oxidierte Luciferin-Molekül emittiert ein Lichtquant.



L = oxidiertes Luciferin

LH₂ = reduziertes Luciferin

$\bigcirc$ = Luciferase

(De LUCA und Mc ELROY 1974)

1952 beschrieben STREHLER und TOTTER die erste Anwendung der Biolumineszenz in vitro und zeigten die weite Einsatzfähigkeit dieser Methode. Es kann nicht nur in Zellen vorhandenes ATP gemessen werden, sondern es können auch enzymatische Reaktionen gemessen werden, die ATP umsetzen. Hierbei kommt es auf Grund eines erhöhten ATP-Verbrauches zu einem Abfall der Lumineszenz. Wenn eine bekannte Menge ATP vorgegeben wird, sind aus der Differenz der für eine Standardlösung erhaltenen Werte und der Werte des Enzymansatzes, Rückschlüsse auf den Enzymgehalt einer Probe möglich.

Ferner zeigte sich, daß es sich hierbei um ein hochempfindliches Verfahren handelt, mit dem schon geringe ATP-Mengen nachgewiesen werden können.

Methoden der ATP - Analyse (STREHLER und TOTTER 1956)

Methode:	Empfindlichkeit in $\mu\text{g-P}$: (untere Grenze)	Bemerkungen:
1. Chem. Trennung	10 - 50	Verluste durch Löslichkeit der Salze
2. Ionenaustauscher	5 - 30	relativ einfach
3. Hexokinase	ca. 20 (Manometer) ca. 2 (in 7 Minuten hydrolysierbares ~P)	mittel in Aufwand und Schnelligkeit
4. Deaminase	ca. 20	auf klare Lösungen beschränkt, wenn nicht mit 1 oder 2 kombiniert
5. Luciferin - Luciferase	10^{-1} (Photofluorometer) 10^{-3} - 10^{-4} (Quantenzähler)	schnell und relativ einfach

Als enzymatische Reaktion ist das Verfahren von Temperatur und pH des umgebenden Mediums abhängig. Das Optimum für die Aktivität kristalliner Luciferase liegt bei 23 °C, bei höheren Temperaturen kommt es zu einer reversiblen Inaktivierung des Enzyms. Oberhalb 35 °C wird die Inaktivierung irreversibel.

Die maximale Lichtemission liegt bei einem pH von 7,8, wenn ein Glycin- oder Phosphatpuffer verwendet wird (GREEN und Mc ELROY 1956).

Außerdem wird die Reaktion durch verschiedene Ionen beeinflusst. ALEDORT, WEED und TROUP (1966) geben an, daß äquimolare Konzentrationen (97 mM) der folgenden Kationen die Lichtemission verringern:

Kation:	relative Lichtemission:
----	1.0
Cholin ⁺	0,35
Li ⁺	0,27
Rb ⁺	0,08
Na ⁺	0,04
K ⁺	0,03
Ca ⁺⁺	0,00

Sie untersuchten auch die Auswirkung von Anionen auf die Lichtemission und fanden, daß Acetat⁻ die geringste Wirkung hat. Es folgen HCO₃⁻, F⁻, Cl⁻, Br⁻, die zunehmend die Lichtemission verringern. J⁻ vermag die Lumineszenz total zu unterdrücken. DENBURG und Mc ELROY (1970) geben eine zunehmende Behinderung der Lichtemission durch folgende Anionen an: Cl⁻ < Br⁻ < NO₃⁻ < J⁻ < SCN⁻.

GILLES, PEQUEUX, SAIVE, SPRONCK und THOME-LENTZ (1976) untersuchten ebenfalls den Einfluß von Anionen auf die

Lichtemission und kamen zu folgendem Ergebnis:

Acetat⁻, Cl⁻, J⁻, ClO₄⁻ und KClO₄⁻ behindern zunehmend die Lichtemission. Der Einfluß der Anionen auf die Lumineszenz ist sehr viel größer als der Einfluß von Kationen. Der Grund dafür ist in der Tatsache zu suchen, daß die oben angeführten Anionen in Form ihrer Salze zur Extraktion von ATP verwendet werden und dadurch in großen Mengen im Reaktionsgemisch vorhanden sind. Sie behindern wahrscheinlich die Reaktion zwischen ATP und Luciferase durch kompetitive Hemmung.

2. 2. Anwendungsbeispiele:

Durch das Biolumineszenzverfahren erweiterten sich die Möglichkeiten in biologischen Systemen AMP, ADP oder ATP nachzuweisen beträchtlich. Hier seien nur einige Beispiele aus der Fülle von Untersuchungen angeführt, die in den letzten Jahren durchgeführt wurden.

BREWER und KNUTSEN (1966) untersuchten den ATP-Gehalt von Erythrozyten und fanden, daß die Anwesenheit von Hämoglobin und Proteinen im Reaktionsgemisch zu einer beträchtlichen Erhöhung der Lichtemission führt. Aber auch wenn sie um 25% niedrigere Meßwerte annahmen, lagen die Werte für den ATP-Gehalt von Erythrozyten immer noch um 25% über den mit herkömmlichen Methoden gemessenen Werten (Bestimmung des ATP-Gehaltes mit Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase).

BEUTLER und MATHAI (1967) setzten darauf den ATP-Standardlösungen sehr viel höhere Proteinkonzentrationen zu und konnten so den "Proteinfehler" korrigieren. Sie kamen zu den Werten von 3,86 - 4,05 $\mu\text{mol ATP /g Hämoglobin}$ bzw. 69,2 - 113 $\mu\text{mol ATP/100ml Erythrozyten}$.

DUFRESNE und GITELMAN (1970) untersuchten den ATP-Gehalt einer Suspension gewaschener Erythrozyten mit bekanntem Hämatokrit von 20 - 30%. Sie entwickelten ein halbautomatisch arbeitendes Verfahren, um den Arbeitsaufwand bei der ATP-Messung zu reduzieren. Sie kombinierten einen Auto-Analyzer mit einem Scintillations-Spectrometer und konnten auf diese Weise bis zu 30 Proben in der Stunde untersuchen. Die Standardabweichungen für die einzelnen Meßwerte lagen zwischen $1,21 \pm 0,005$ und $7,67 \pm 0,034 \times 10^{-5}$ M ATP für verschiede-

dene ATP-Konzentrationen. Einflüsse anorganischer Salze wurden durch die enorme Verdünnung der gemessenen Proben (1 : 1000) vermieden.

HOLMSEN, HOLMSEN und BERNHARDSEN (1966) untersuchten im Rahmen der Thrombose-Forschung das Vorkommen von ATP und ADP im Plasma. Thrombozyten in Citratplasma benötigen für eine optimale Aggregation etwa $0,4 \mu\text{M}$ ADP. Der Nachweis von weniger als $5 \mu\text{M}$ ADP im Plasma mit herkömmlichen Methoden ist aber sehr schwierig und es sind dazu große Plasmamengen notwendig. Pyruvat-Kinase überträgt Phosphorsäure von Phosphoenol-Pyruvat auf ADP. Es entsteht ATP. Diese Reaktion bringt 100% Ausbeute und es kann leicht von ihrem ATP-Ertrag auf den ADP-Gehalt einer Probe geschlossen werden.

Die Untersuchungen von HOLMSEN und Mitarbeitern zeigten, daß sich schon $0,02 \mu\text{M}$ ADP oder ATP im Plasma mit einer Genauigkeit von $\pm 6\%$ bestimmen ließen. Die anfängliche Lichtemission (initial light flash) der Luciferin-Luciferase-Reaktion war proportional der Konzentration von ADP und ATP.

HOLMSEN, STORM und DAY (1972) entwickelten diese Methode weiter, um den ATP- und ADP-Gehalt von Thrombozyten zu messen.

Es besteht weiterhin noch eine Fülle von Einsatzmöglichkeiten für die Biolumineszenz im Bereich der Biochemie und klinischen Biochemie:

JOHNSON, HARDMAN, BROADUS und SUTHERLAND (1970) wiesen mit Hilfe der Biolumineszenz cyclisches ATP in menschlichem Urin nach. Adenosin-3'-5'-Monophosphat läßt sich

durch Phosphodiesterase, Myokinase und Pyruvatkinase in ATP umwandeln. Steigende Werte von cyclischem AMP ergeben steigende ATP-Werte.

LIN und COHEN (1968) konnten bei Untersuchungen an Streckrezeptorzellen von Flußkrebsen ATP noch bis zu einer Konzentration von 2×10^{-14} Mol nachweisen.

BROOKS (1970) untersuchte den ATP- und ADP-Gehalt von Bullenspermien unter verschiedenen Bedingungen.

ZULAK, PATTON und HAMMERSTEDT (1976) untersuchten das Vorkommen von ATP in Ziegenmilch und kamen zu folgenden Ergebnissen:

Das Morgengemelk enthielt weniger ATP als frisch sezernierte Milch. Experimente mit entrahmter Milch brachten entsprechende Unterschiede zwischen dem Morgengemelk und darauf folgenden Gemelken. Beim Zusatz von Verbindungen, die die oxidative Phosphorylierung und die Substratketten-Phosphorylierung hemmen, war der Abfall von ATP innerhalb vier Stunden wesentlich deutlicher als ohne diese Inhibitoren. Es wurden außerdem einige Frauen- und Kuhmilchproben untersucht. Sie enthielten wesentlich geringere ATP-Konzentrationen als Ziegenmilch.

ATP läßt sich nicht nur in tierischen Zellen, sondern auch in Pflanzen-Zellen bestimmen. Hier reicht das Spektrum der Veröffentlichungen von der ATP-Bestimmung in Grünalgen (ST. JOHN, 1970) bis zur ATP-Messung in höheren Pflanzen (GUINN und EIDENBOCK, 1972).

Auch bei Bakterien ist der Nachweis von ATP mit Luciferin - Luciferase möglich.

So zeigten COLE, WIMPENNY und HUGHES (1967), daß der ATP-Gehalt von E. coli in einem komplexen Medium in dem Maß zunimmt, in dem die Kultur wächst. Veränderungen in der Zusammensetzung des Mediums führten zu Schwankungen des ATP-Gehaltes.

Die ATP-Zunahme während des Wachstums gilt auch für andere Bakterien (D'EUSTACHIO und LEVIN, 1967; D'EUSTACHIO, JOHNSON und LEVIN, 1968) und läßt sich für den Nachweis von Antibiotika ausnützen.

Kulturen, denen ein Antibiotikum zugesetzt wird, zeigen einen deutlichen Abfall des ATP-Gehaltes im Vergleich zu Kontrollkulturen. THORE, NILSSON, HÖJER, ÅNSÉHN und BRÖTE (1977) fanden eine positive Korrelation zwischen der durch Antibiotika induzierten Abnahme des ATP-Gehaltes einer Kultur und der Größe der Hemmhöfe beim Agar-Diffusions-Test.

HARBER und ASSCHER (1977) verwendeten diese Nachweismethode ebenso wie NILSSON, HÖJER, ÅNSÉHN und THORE (1977), um den Gentamycinspiegel in Serum von Patienten zu kontrollieren.

WESTHOFF und ENGLER (1975) wiesen mit dieser Methode Penicillin in Milchproben nach.

2. 3. ATP-Messungen mit dem LUMAC^R - System:

In dem Maße, in dem sich der ATP-Nachweis mit Luciferin - Luciferase bewährte, wuchs das Interesse an der Biolumineszenz. Es war nur eine Frage der Zeit, bis speziell für die Lumineszenzmessung geeignete Photometer und Reaktionsansätze hergestellt wurden.

So bietet z.B. die Firma LUMAC^R Systems AG Reagentien und Photometer zum ATP-Nachweis an. Es sind bisher drei Veröffentlichungen erschienen, in denen über ATP-Bestimmungen mit dem LUMAC^R-Versuchsansatz berichtet wird.

PRINZEN (1977) untersuchte den ATP-Gehalt frischer und tiefgefrorener Bullenspermien. Verschiedene Auftautemperaturen ergaben unterschiedliche ATP-Werte. Bei gelagerten Spermien fiel der ATP-Gehalt deutlich ab. Die ATP-Werte waren in hohem Maße mit der Vorwärtsbeweglichkeit der jeweiligen Spermaprobe korreliert.

BOSSUYT (1978) untersuchte, ob Zellgehalt und ATP-Gehalt einer Milchprobe miteinander korreliert sind. Er fand, daß bei Zusatz steigender ATP-Konzentrationen zu zellarmer Milch eine lineare Beziehung zwischen ATP-Konzentration und gemessener Lichtemission besteht. Die Wiederholbarkeit der Meßergebnisse war gut, der Variationskoeffizient lag in allen Fällen unter 10%. Der ATP-Gehalt gekühlter Milch nahm bei längerer Lagerung langsam ab. Der Zellgehalt nahm in der gleichen Zeitspanne weniger deutlich ab. Bei gleichen Entnahme- und Lagerbedingungen zeigte sich eine enge Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Zellzahl ($r = 0,91$).

WALSER, PRINZEN und BRUNNER (1978) versuchten ebenfalls den Zellgehalt in der Milch durch ATP-Messung zu bestimmen. Die Wiederholbarkeit ihrer Meßergebnisse war schlechter, der Variationskoeffizient lag zum Teil über 20 %. Die ATP-Konzentration gelagerter Milch nahm in den ersten 5 bis 6 Stunden nach der Entnahme stark ab, in den folgenden Stunden war der ATP-Abfall nur noch gering. Zwischen Lichtemission und Zellgehalt bestand eine signifikante Beziehung ($r = 0,67$). ATP-Zusatz zu Milchproben ergab eine lineare Beziehung zur Lichtemission. Die Standardgeraden wiesen in Abhängigkeit von der LUMIT^R-Charge eine unterschiedliche Steilheit auf.

3. Eigene Untersuchungen:

3. 1. Material und Methoden:

Der ATP-Gehalt verschiedener Milchproben wurde mit den LUMAC^R-Celltestern M 1020 und M 1030 gemessen (LUMAC^R Systems AG, Basel, Schweiz). Die für die Reaktion erforderlichen Reagentien Luciferin - Luciferase = LUMIT^R, Nucleotide Releasing Reagent = NRS^R, HEPES - Mg - Puffer und ATP-Standard wurden von derselben Firma bezogen.

Für die Messung des ATP-Gehaltes einer Milchprobe werden 50 μ l Milch und 50 μ l NRS in einer Küvette gemischt. NRS bewirkt laut Firmenangabe, daß die Zellmembran somatischer Zellen für kleine Moleküle wie ATP durchlässig wird und diese quantitativ freigesetzt werden, während große Moleküle wie Proteine und Enzyme in der Zelle verbleiben.

Das in HEPES - Puffer gelöste LUMIT^R wird beim Celltester M 1020 in ein Dispensiergerät gefüllt (Hamilton PB 600-1 Repeating Dispenser). Bei Erscheinen des Nullwertes auf der Digitalanzeige des Gerätes werden 100 μ l LUMIT^R zum Reaktionsgemisch gegeben. Der Celltester M 1030 arbeitet vollautomatisch.

Das von der Probe emittierte Licht wird in Impulsen gemessen, die über 5, 10 oder 40 Sekunden integriert und angezeigt werden. Es ist auch möglich, das Gerät so zu schalten, daß die Lumineszenz alle 2,4 Sekunden gemessen und angezeigt wird. Die Lichtemission der einzelnen Proben wurde, wenn nichts anderes angegeben, 2x gemessen und daraus der Mittelwert gebildet.

Es wurden 1/4 und 4/4 Gemelksproben untersucht. Mit jeder Probe wurde zur groben Orientierung ein Schalmtest durchgeführt. Die einzelnen Proben wiesen Zell-

gehalte von 0 bis über 5 Millionen auf, waren optisch aber nicht verändert.

Die Milch wurde sofort nach der Probennahme oder später untersucht (Lagerung bei Zimmertemperatur 20°C).

Bei einem Teil der Milchproben wurden die Zellen im Ausstrichverfahren nach der Methode von LEIDL, SCHALM und LÜPS (1961) gezählt.

Eiweiß- und Fettgehalt einiger Milchproben wurden in dem der Milchunion Oberbayern angeschlossenen Milchprüfring mit dem Infra-Rot-Milch-Analysator (Milco-Scan, Foss-Electric, Dänemark) gemessen.

ATP-Standard: Aus dem 10 µg enthaltenden ATP-Standard wurden mit sterilem Aqua dest. Verdünnungsreihen hergestellt. Zu den Milchproben wurden im allgemeinen 10 µl ATP-Lösung zugesetzt.

3. 2. Ergebnisse:

3. 2. 1. Reaktionskinetik:

NRS^R macht die Zellmembran somatischer Zellen für kleine Moleküle wie z. B. Nucleotide durchlässig. Diese werden innerhalb weniger Sekunden quantitativ aus den Zellen freigesetzt. Die Reaktion ist zeitabhängig. Es muß eine bestimmte Zeit nach dem Mischen von Milchprobe und NRS^R verstreichen, bis ATP außerhalb der Zelle erscheint.

Um den besten Zeitpunkt für die Messung des ATP-Gehaltes herauszufinden, wurde der Reaktionsverlauf bei 10 Milchproben mit unterschiedlichem Zellgehalt untersucht. Jede Probe wurde 2x gemessen. NRS^R und Milchprobe wurden gemischt und die Lichtemission fortlaufend alle 2,4 Sekunden aufgezeichnet.

Die Lichtemission erreichte in 12 Sekunden bis 3 1/2 Minuten den für die jeweilige Probe spezifischen Maximalwert, der über 2,4 bis 52,8 Sekunden anhielt. Danach sank die Lichtemission langsam ab. Bei zwei Proben war bis zu 30 Minuten nach Meßbeginn noch Lumineszenz nachweisbar (Abb. 1).

Die zweite Meßreihe zeigte, daß der zeitliche Verlauf der Reaktion für die einzelnen Proben typisch ist (Tabelle 1).

Nimmt man zu dem Maximum den um 0,1 kleineren Wert dazu, ergibt sich ein deutliches Plateau (9,6 - 76,8 Sekunden), dessen Werte nach 14,4 bis 127,2 Sekunden erreicht sind. Von 10 untersuchten Milchproben hatten

sechs in einem Zeitraum von 50 - 70 Sekunden nach Meßbeginn (= 55 - 75 Sekunden nach Reaktionsbeginn) das Maximum der Lichtemission erreicht. Zwei weitere Proben erreichten es 2,4 - 4,8 Sekunden später (Tabelle 1 und 2).

Wartet man nach Reaktionsbeginn 60 Sekunden und mißt dann erst die Lumineszenz, erhält man einen kurzen steilen Anstieg der Meßwerte. Die maximale Lichtemission ist schon nach 12-14 Sekunden erreicht, bleibt kurz bestehen und fällt dann wieder ab (Abb. 2). Diese Kurve ähnelt in ihrem Verlauf sehr stark derjenigen von ATP in Wasser plus NRS^R (Abb.2). Wenn man nach einer Wartezeit von 60 Sekunden ATP zum Reaktionsansatz gibt, erhält man einen vergleichbaren Verlauf der Lichtemission (Abb.2).

Mischt man dagegen ATP, Milch und NRS^R und mißt sofort die Lumineszenz, erhält man einen langsamen Anstieg der Werte und ein deutliches Plateau (Abb.1). Setzt man gleiche ATP-Konzentrationen zu, liegen die Meßwerte deutlich unter denen, die man erhält, wenn man 60 Sekunden wartet, bevor man das ATP zusetzt (vergleiche Abb. 1 und 2, Tabelle 3).

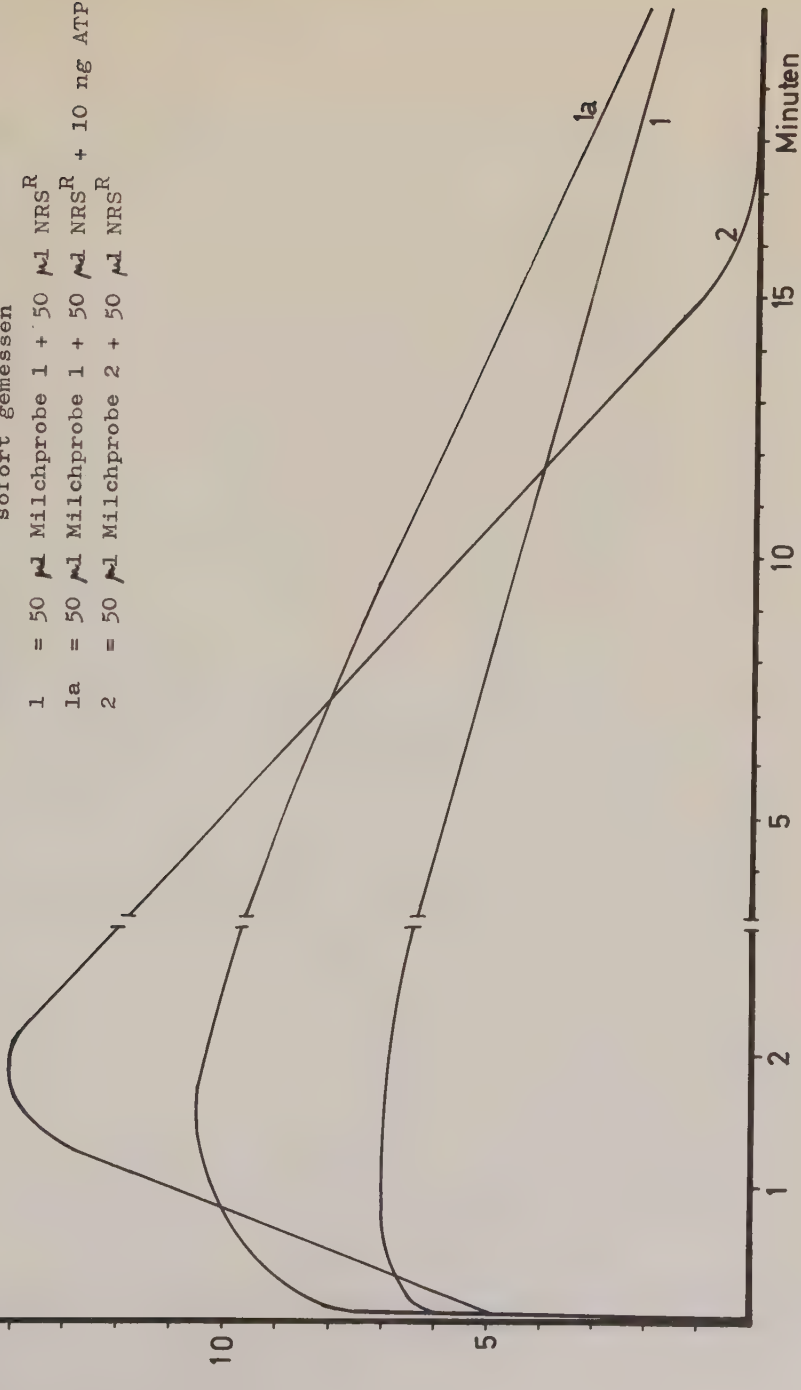
Vergleicht man die Maximalwerte einer Probe, deren Lichtemission alle 2,4 Sekunden gemessen wird mit den Werten, die man erhält, wenn die Lichtemission über 10 Sekunden integriert wird, stimmen sie weitgehend überein (Tabelle 4), wenn zwischen Probenansatz und Messung 40 - 60 Sekunden gewartet wird.

Unter diesen Bedingungen über 5 oder 40 Sekunden integrierte Werte weichen stark nach unten bzw. nach oben ab.

Bei allen weiteren Messungen wurde nach Ansatz des Reaktionsgemischs 50 - 60 Sekunden gewartet, bevor die Probe gemessen wurde. Bei Wechsel der LUMIT^R-Charge wurde die Reaktionskinetik überprüft, ebenso wenn die einzelnen Meßwerte einer Probe stark schwankten.

Abbildung 1: Reaktionsverlauf, Ansatz
sofort gemessen

1 = 50 μ l Milchprobe 1 + 50 μ l NRS^R
 1a = 50 μ l Milchprobe 1 + 50 μ l NRS^R + 10 ng ATP
 2 = 50 μ l Milchprobe 2 + 50 μ l NRS^R



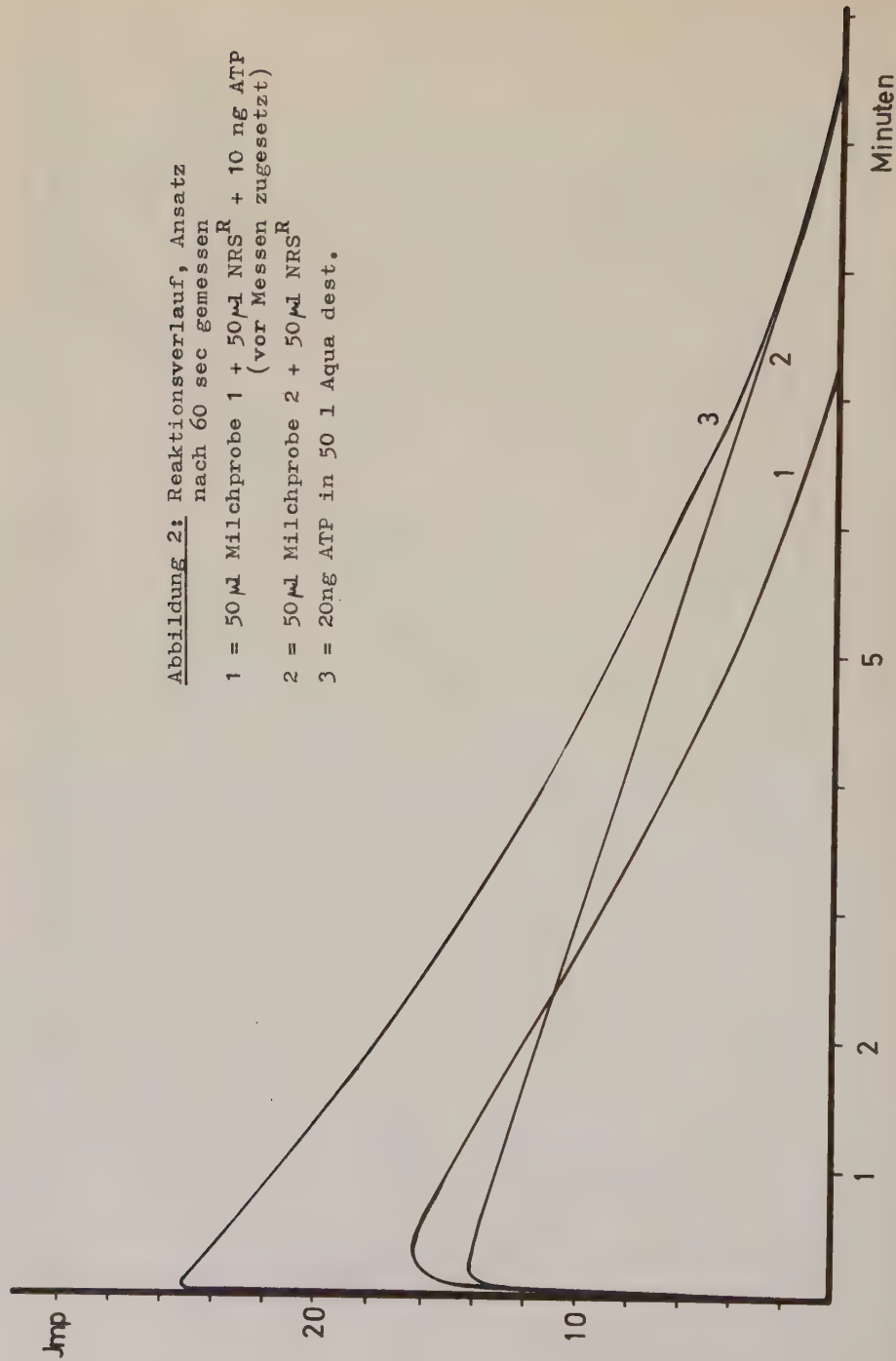


Abbildung 2: Reaktionsverlauf, Ansatz
nach 60 sec gemessen

- 1 = 50 μ l Milchprobe 1 + 50 μ l NRS^R + 10 ng ATP
(vor Messen zugesetzt)
- 2 = 50 μ l Milchprobe 2 + 50 μ l NRS^R
- 3 = 20ng ATP in 50 l Aqua dest.

3. 2. 2. Wiederholbarkeit der Meßergebnisse:

Die Wiederholbarkeit der Meßergebnisse wurde an Milchproben mit verschiedenen Zellgehalten und unterschiedlichem Alter überprüft. 25 Proben wurden je 10x gemessen, 50 Proben je 5x.

10 Ansätze mit ATP-Lösungen verschiedener Konzentrationen wurden je 5x gemessen.

Dabei ergibt sich folgendes Bild (Tabelle 5 - 7):

Bei 10 Meßwerten pro Probe schwankt der Variationskoeffizient zwischen 3,9% und 46,6%. Bei 11 Proben liegt der Variationskoeffizient unter 10%, bei 14 Proben über 10%. Vier davon haben einen Variationskoeffizienten über 20%.

Bei fünf Meßwerten pro Probe liegen 24 unter 10%, 26 darüber, davon 5 über 20%.

Von den 10 Ansätzen mit ATP in destilliertem Wasser haben 8 einen Variationskoeffizienten unter 10%, zwei liegen unter 20%.

Alter und Lagerungstemperatur einer Probe haben **keinen** Einfluß auf die Wiederholbarkeit der Messung.

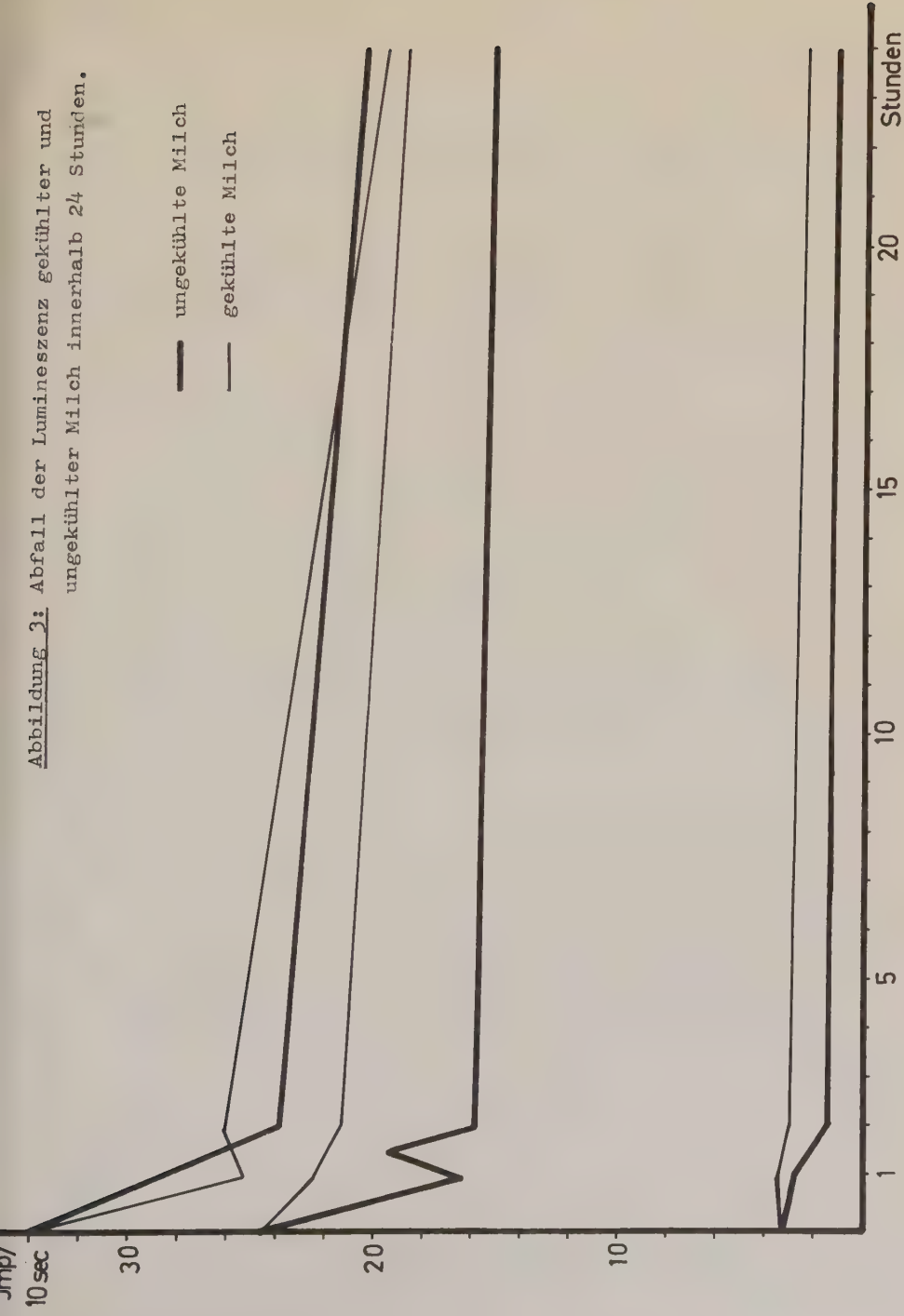
3. 2. 3. Änderung der Meßergebnisse in Abhängigkeit von Zeit und Lagerungstemperatur der Milch:

Es wurden 10 Milchproben mit unterschiedlichen Zellgehalten (75000 - 3.075.000 / ml) gekühlt und ungekühlt über 48 Stunden gelagert. Die Lumineszenz wurde nach 1, 2, 4, 24 und 48 Stunden gemessen. Innerhalb der ersten Stunden fiel die Lumineszenz deutlich ab, danach nur noch langsam. Bei der ungekühlten Milch sanken die Meßwerte wesentlich schneller ab als bei den gekühlten Proben (Abb. 3).

Der Zellgehalt der einzelnen Proben fiel im Durchschnitt innerhalb von 48 Stunden um 75000 Zellen.

Außerdem wurden vier Milchproben mit einem Zellgehalt von max. 75000 Zellen / ml untersucht. Es wurde nicht nur die Lumineszenz nach Zusatz von NRS^{R} gemessen, sondern auch die Lichtemission ohne NRS^{R} -Zusatz. Um ein gleiches Probenvolumen zu erhalten, wurden statt NRS^{R} 50 μl steriles Aqua dest. zugesetzt. Bei der mit NRS^{R} gemessenen Milch fielen die Meßwerte über 48 Stunden ab. Bei der unbehandelten Milch nahmen sie während der ersten 24 Stunden zu, bei drei Proben fielen sie in den nächsten 24 Stunden ab, bei der vierten Probe stiegen sie weiter an (Tabelle 8).

Abbildung 3: Abfall der Lumineszenz gekühlter und ungekühlter Milch innerhalb 24 Stunden.



3. 2. 4. Messung der Lumineszenz verschiedener ATP-Konzentrationen in Aqua dest.:

Der von LUMAC^R gelieferte ATP-Standard wurde in 0,5 ml sterilem destilliertem Wasser aufgelöst. Diese Lösung wurde verdünnt und Proben mit verschiedenen ATP-Konzentrationen hergestellt.

Die Lichtemission verschiedener Verdünnungsstufen (10 - 500ng ATP / 50 μ l Aqua dest.) wurde mit drei verschiedenen LUMIT^R-Chargen gemessen.

In allen Fällen stieg die Lichtemission bis zu einer ATP-Konzentration von 100 ng/ 50 μ l Aqua dest. linear an. Bei zwei Chargen wurde der Anstieg bei höherem ATP-Gehalt flacher, bei einer Probe blieb er unverändert. Alle drei Chargen reagierten mit unterschiedlicher Lichtemission auf gleiche ATP-Mengen. So reichten z. B. die Meßwerte für 100ng ATP / 50 μ l von 123 bis 164 Lichteinheiten (Abb. 4)

Weiterhin zeigt sich, daß die Lumineszenz nicht nur von der ATP-Konzentration, sondern auch von dem Volumen der Probe abhängig ist. Bei gleichem ATP-Gehalt sank die Lichtemission, wenn man das Proben-Volumen vergrößerte. Der Zusatz von NRS^R zur Probe bewirkt trotz größeren Probenvolumens einen deutlichen Anstieg der Lumineszenz (Abb. 5). Auch hier bestanden Unterschiede zwischen den einzelnen LUMIT^R - Chargen.

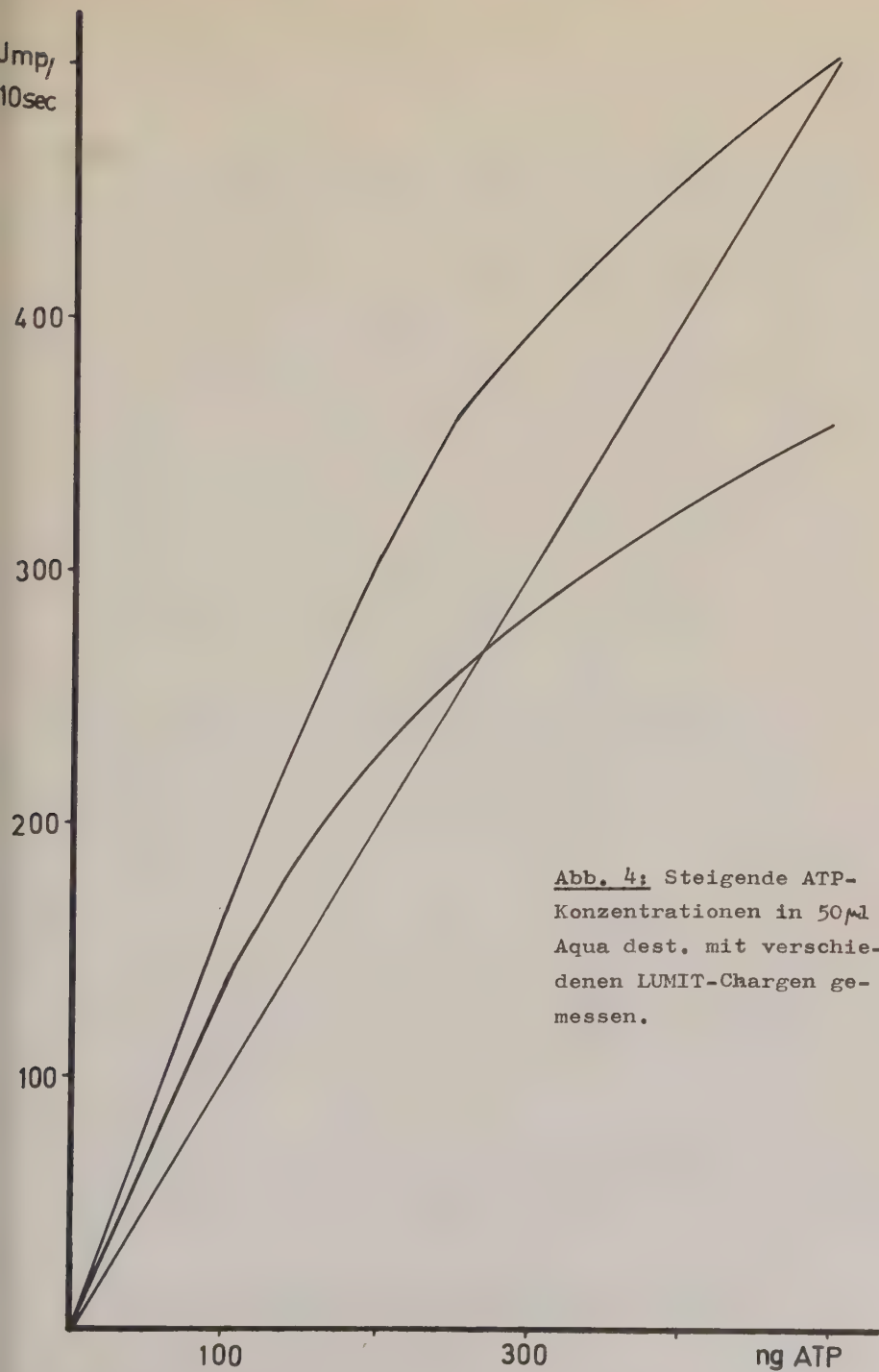
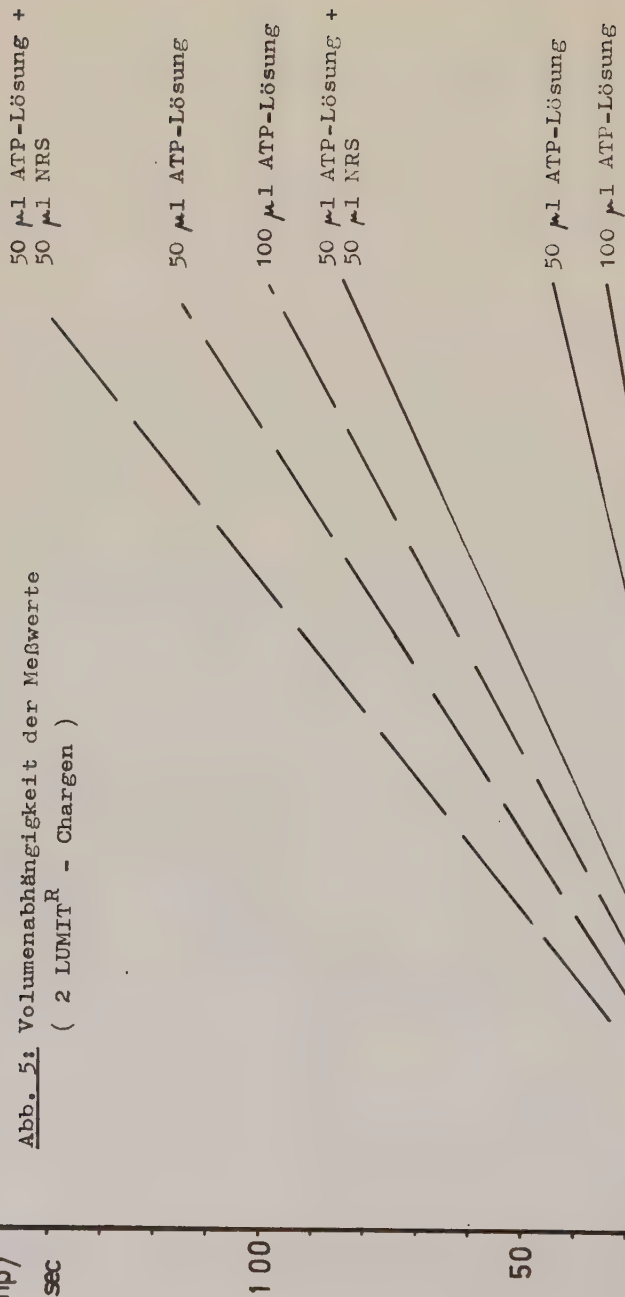


Abb. 4: Steigende ATP-Konzentrationen in 50 μ l Aqua dest. mit verschiedenen LUMIT-Chargen gemessen.

Jmp/
10sec

Abb. 5: Volumenabhängigkeit der Meßwerte
(2 LUMIT^R - Chargen)



3. 2. 5. Messung verschiedener ATP-Konzentrationen in Milch:

Von sechs Milchproben wurde die Lichtemission folgender Ansätze gemessen:

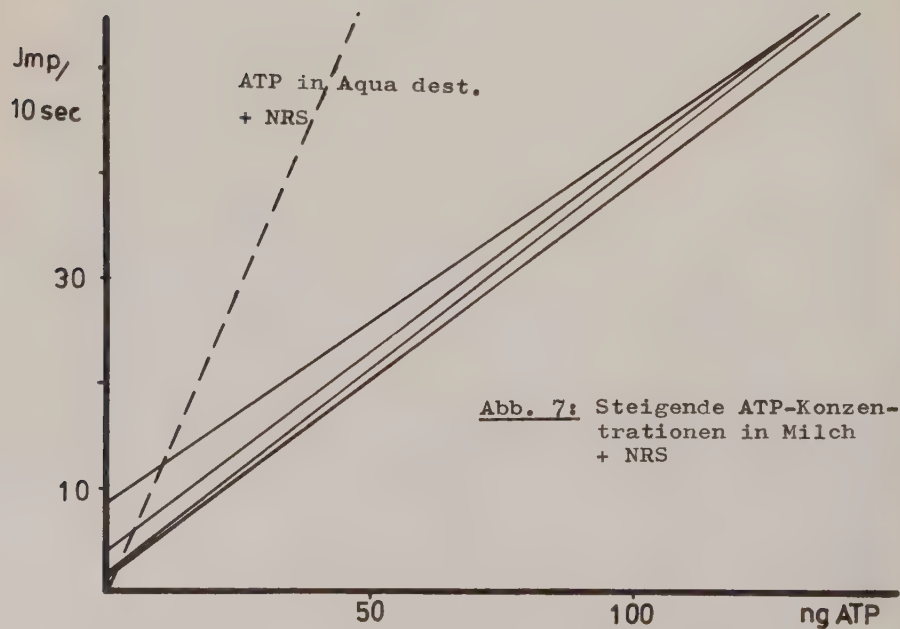
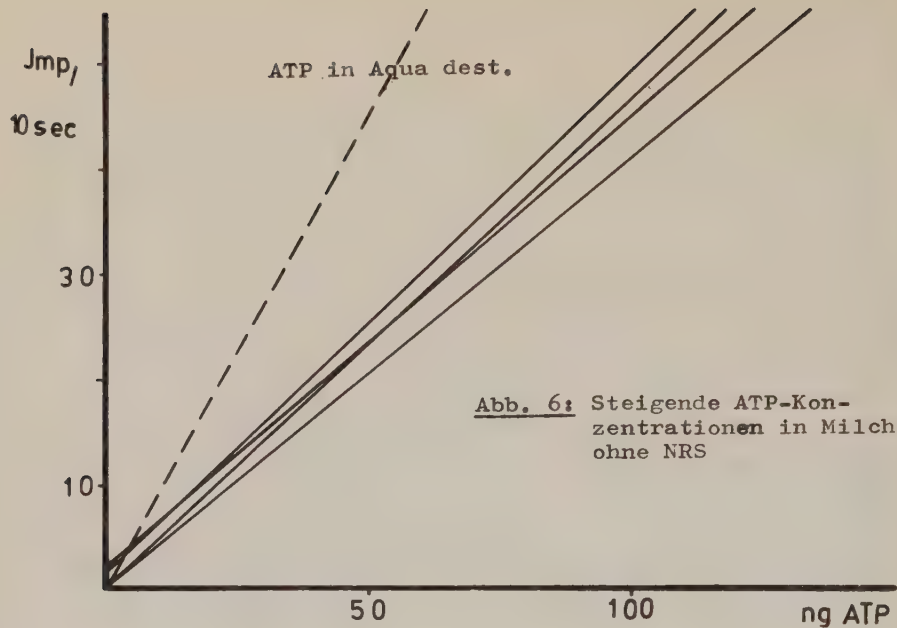
50 μ l Milch, 100 μ l Milch, 50 μ l Milch + 50 μ l steriles destilliertes Wasser.

In allen Fällen konnte Lumineszenz festgestellt werden, d.h. es waren freies ATP oder lumineszierende Substanzen in der Probe. Die Werte für ein Probenvolumen von 100 μ l lagen im allgemeinen unter den 50 μ l Werten. Die Lumineszenz der Aqua dest. haltigen Proben lag deutlich höher. Vergleicht man diese Werte mit den Ergebnissen, die man erhält, wenn man NRS^R zusetzt, sind sie kleiner als die Differenz jener Werte (Tabelle 9).

Der letzte Ansatz wurde bei 15 weiteren Milchproben gemessen und lieferte das gleiche Ergebnis. Bei Berechnungen des ATP-Gehaltes (s.u.) wurde deshalb die Lumineszenz ohne NRS^R - Zusatz nicht berücksichtigt.

Vier Milchproben wurden steigende ATP-Konzentrationen zugesetzt und die Lumineszenz gemessen. Der Lichtanstieg der einzelnen Proben war linear. Die Meßreihe wurde mit NRS^R wiederholt, auch hier war ein linearer Anstieg der Meßwerte zu beobachten (Abb. 6 und 7).

Ein Vergleich mit ATP in Aqua dest. zeigt, daß in der wässrigen Lösung die Lichtemission derselben ATP-Konzentration sehr viel höher ist.



Acht Milchproben mit NRS^R wurden mit verschiedenen ATP-Lösungen gemischt (1, 2, 3, 4, 5, 10 und 20 ng) und die Lichtemission gemessen. Erst ab einer Konzentration von 5 ng ATP stiegen die Meßwerte linear an. In dieser Meßreihe wurden je vier Proben mit LUMIT^R einer Charge gemessen. Auch hier lieferten die einzelnen Chargen unterschiedliche Meßwerte für gleiche ATP-Konzentrationen (Abb. 8).

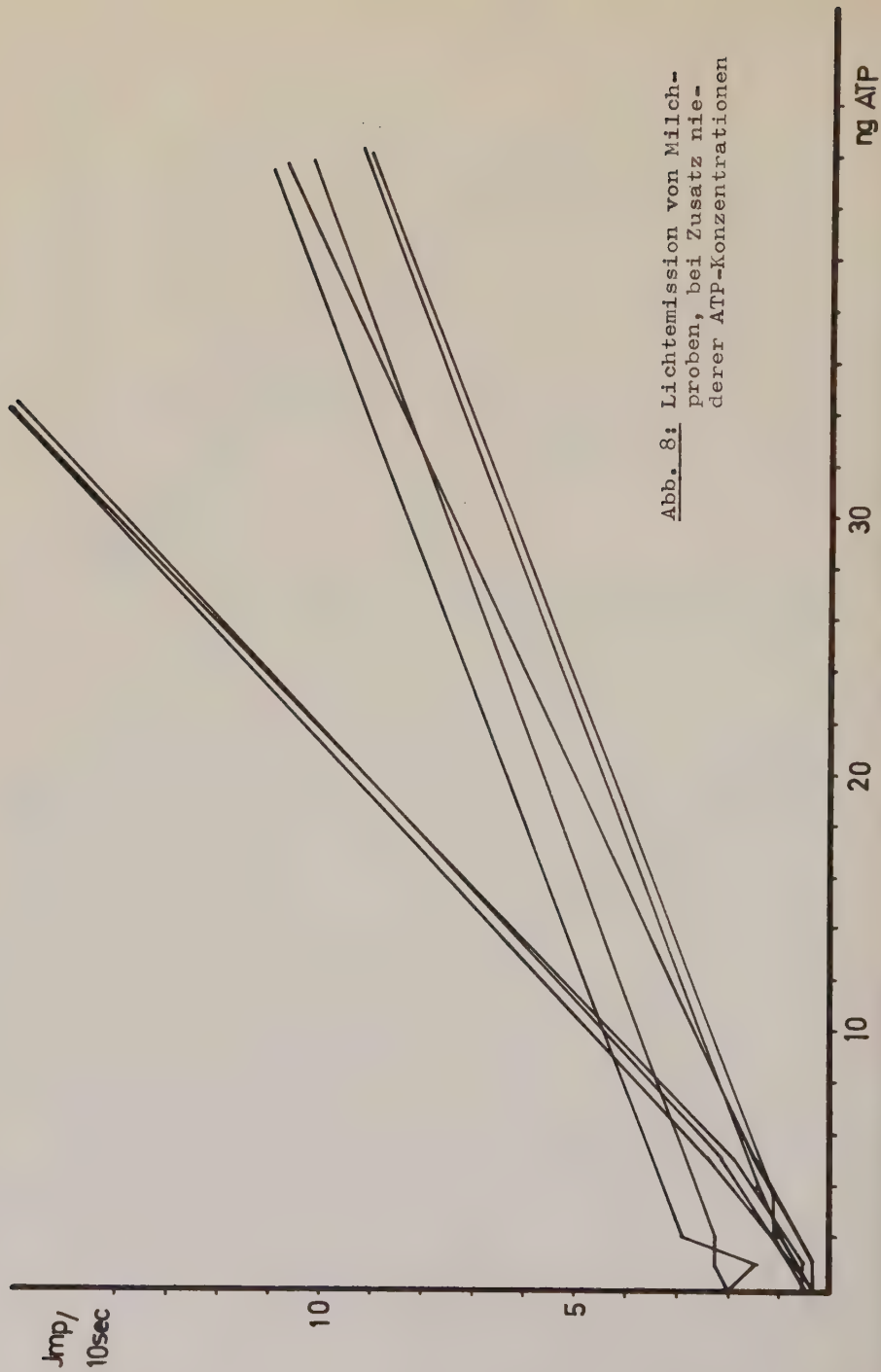


Abb. 8: Lichtemission von Milchproben, bei Zusatz niedriger ATP-Konzentrationen

3. 2. 6. Einfluß von Fett- und Eiweißgehalt einer Probe auf die Lumineszenz:

Sieben Milchproben mit geringem Zellgehalt (75000 - 140 000 Zellen / ml) wurden mit verschiedenen ATP-Konzentrationen versetzt und der Anstieg der Lichtemission gemessen.

Von diesen Proben wurden der Fett- und Eiweißgehalt bestimmt. Der Fettgehalt schwankte zwischen 1,18 % und 3,53 %, der Eiweißgehalt zwischen 2,85 % und 3,38 %. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen unterschiedlichem Anstieg der Lumineszenz auf gleiche ATP-Konzentrationen und dem Fett- oder Eiweißgehalt herstellen.

3. 2. 7. Korrelationen zwischen Zellgehalt, Lichtemission und ATP-Gehalt verschiedener Milchproben:

In drei Meßreihen mit drei LUMIT^R - Chargen wurden insgesamt 51 Milchproben untersucht ($n = 11$, 22 und 18). Es wurde sowohl die Gesamtzellzahl als auch der Leukozytengehalt der einzelnen Proben bestimmt.

In allen Fällen bestand zwischen Lichtemission und Gesamtzellzahl bzw. Leukozytengehalt eine statistisch gesicherte Beziehung. Bei einer Meßreihe waren beide Zellzahlen hochsignifikant mit der Lichtemission korreliert (r Gesamtzellgehalt = 0,83, r Leukozyten = 0,78, $p < 0,001$). Bei den beiden anderen Meßreihen waren einmal der Gesamtzellgehalt und einmal der Leukozytengehalt deutlich besser mit der Lichtemission korreliert (Tabelle 10) (Abb. 9).

Zu den einzelnen Proben wurden jeweils 10 ng ATP zugesetzt und aus dem Anstieg der Lichtemission der ATP-Gehalt errechnet. Versucht man den ATP-Gehalt einer Probe mit dem Zellgehalt in Beziehung zu setzen, so ergibt sich für kleine Probenzahlen ($n = 24$) keine signifikante Korrelation. (Im gleichen Falle waren Lichtemission und Zellgehalt mit $r = 0,88$ und $p < 0,001$ hochsignifikant korreliert. $y = 0,08 + 0,02x$) Erst bei größeren Probenzahlen besteht eine Beziehung zwischen ATP-Gehalt und Zellzahl. Der Unterschied zwischen den einzelnen Chargen hat keinen Einfluß auf den errechneten ATP-Gehalt.

Bei insgesamt 61 untersuchten Proben betrug $r = 0,59$, d. h. die Beziehung war mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,001$ hochsignifikant. Für die dazu gehörende Kurve gilt die Gleichung: $Y = 1,28 + 0,07 X$ (Abb. 10).

Die Beziehung zwischen Leukozytengehalt und ATP-Gehalt dieser Proben war nicht signifikant ($r = 0,24$).

Zwischen Lichtemission und ATP-Gehalt der Proben bestand in keinem Falle eine Beziehung.

Jmp
/10sec

Abb. 9: Beziehung zwischen Zell-
zahl und Lumineszenz

$$y = 1,89 + 0,01 x$$

$$r = 0,83 \quad p < 0,001$$

5

50

100

$\times 10^4$ Zellen/ml

10^2 ng
ATP
/ml

5

50

100

$\times 10^4$ Zellen/ml

Abb. 10: Beziehung zwischen
Zellzahl und ATP-Gehalt

$$y = 1,28 + 0,07 x$$

$$r = 0,59 \quad p < 0,001$$

4. Besprechung der Ergebnisse:

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es möglich ist, mit dem LUMAC^R - Verfahren über den Weg der ATP-Messung routinemäßig den Zellgehalt von Milchproben zu bestimmen.

Deshalb wurde zuerst untersucht, ob und unter welchen Bedingungen die Meßergebnisse reproduzierbar sind.

Verfolgt man den Anstieg der Lichtemission über einen längeren Zeitraum (Abb. 1), stellt man fest, daß bei Meßbeginn etwa 50 - 60 % der maximalen Lichtemission erreicht sind. Das heißt, daß ein Teil des in der Milchprobe vorhandenen ATP innerhalb der ersten acht Sekunden - das ist die Zeit, die vom Ansetzen der Probe bis zur Anzeige des ersten Meßwertes verstreicht - freigesetzt wird. Danach nimmt die Lichtemission noch unterschiedlich lange zu.

Leider beschränken sich die Angaben des Herstellers über die Wirkungsweise des Nucleotide Releasing Reagent auf die Aussagen, daß die Zellmembran für kleine Moleküle durchlässig wird und daß die Zellen sterben.

Man ist daher auf Vermutungen angewiesen, wenn man den relativ langen Anstieg der Lumineszenz erklären will. Eine einfache Erklärung wäre die, daß bei grossen Zellzahlen nicht genügend NRS^R in der Probe ist, um alle Zellen gleichzeitig anzugreifen. Außerdem wäre es möglich, daß während des Messens noch ATP

synthetisiert wird oder daß gleichzeitig eine von anderen Molekülen oder Reaktionen stammende Lumineszenz gemessen wird. Für eine dieser Möglichkeiten spricht der langsame Anstieg der Lichtemission in zellarmen Milchproben.

Wartet man längere Zeit, bevor man eine Probe mißt, lassen sich offensichtlich störende Einflüsse ausgleichen, da man dann für verschiedene Proben einen zeitlich einheitlichen Reaktionsverlauf erhält, der mit der Lichtemission von ATP in Aqua dest. durchaus zu vergleichen ist.

Außerdem liegen die maximalen Werte dann in einem ähnlichen Größenbereich, wie die über 10 Sekunden integrierten Werte. Der langsame Abfall der Lumineszenz spricht gegen das Auftreten von ATP-asen, es ist also kein schneller ATP-Abfall zu erwarten, wenn man nach dem Mischen von Milchprobe und NRS^R einige Zeit verstreichen läßt, bevor man die Probe mißt.

Jede Methode ist nur dann brauchbar, wenn die Meßergebnisse unter gleichen Bedingungen wiederholbar sind.

Sowohl bei zehn, als auch bei fünf Meßwerten je Milchprobe hatte nur knapp die Hälfte der Proben einen Variationskoeffizienten unter 10 %. Damit konnten an Hand eines größeren Zahlenmaterials die Ergebnisse von WALSER, PRINZEN und BRUNNER (1978) bestätigt werden.

BOSSUYT (1978) prüfte die Wiederholbarkeit der Messungen an drei Milchproben und erhielt in allen Fällen einen Variationskoeffizienten unter 10 %.

ZULAK, PATTON und HAMMERSTEDT (1976) untersuchten

den ATP-Gehalt von Ziegenmilch. Sie wendeten ein anderes Extraktionsverfahren an, bei dem im Endeffekt eine klare ATP-haltige Lösung gemessen wird. Sie errechneten für fünf Meßwerte pro Probe Variationskoeffizienten von 8,3 - 43,3 %.

Überlegt man, welche Fehlerquellen für die unterschiedlichen Meßwerte einer Probe in Frage kommen, bieten sich folgende Möglichkeiten an:

1. Pipettierfehler,
2. verschiedene Zeitabstände zwischen Reaktionsansatz und Meßbeginn,
3. verzögerte LUMIT^R - Injektion beim Celltester M 1020, abhängig von Reaktionsvermögen (und Tagesform) des Untersuchers,
4. Luftblasen im LUMIT^R,
5. Eigenschaften der Milchbestandteile, die zu Meßfehlern führen.

Die Wiederholbarkeit der Meßergebnisse wurde deshalb nicht nur mit Milch, sondern auch mit zehn verschiedenen ATP-Lösungen überprüft (je 5x gemessen). Hier lagen die Variationskoeffizienten von acht der zehn Proben unter 10 %, obwohl die Messungen mit dem Celltester M 1020 durchgeführt wurden und damit vier der fünf angeführten Fehlerquellen in Frage kamen.

Es bleiben die Eigenschaften der Milchbestandteile als Haupt-Fehlerquelle. Leukozyten haben die Tendenz, sich an Fettkügelchen in der Milch anzulagern und auf diese Weise Zellaggregate zu bilden (SCHALM, CARROLL und JAIN 1971). Steigen die Fettkügelchen beim Aufräumen an die Oberfläche, reißen sie eine große Zahl von Zellen mit und es kommt zu einer

ungleichmäßigen Verteilung der Zellen in den verschiedenen Schichten.

Auch wenn man eine Milchprobe gut schüttelt, bleiben einzelne Zellaggregate bestehen.

Pipettiert man ein solches "Zellnest" in die zu messende Probe, erhöht sich der ATP-Gehalt beträchtlich. Bei einem so empfindlichen Nachweisverfahren, wie es die ATP-Messung mit Luciferin - Luciferase ist, dürften sich bei einem Probenvolumen von $50\mu\text{l}$ in einer zellarmen Milch schon kleine Schwankungen des Zellgehaltes im Meßwert bemerkbar machen. Es ist deshalb empfehlenswert, eine Milchprobe mindestens zweimal, besser vier- bis fünfmal zu messen.

Man sollte außerdem nur frische oder über mindestens vier Stunden gelagerte Milchproben untersuchen. Ungünstig sind die ersten vier Stunden nach dem Melken, da in dieser Zeit sowohl in gekühlter als auch in ungekühlter Milch der ATP-Gehalt stark abfällt, während er in der darauf folgenden Zeit nur noch langsam sinkt.

In Übereinstimmung mit BOSSUYT (1978) konnte außerdem festgestellt werden, daß der Zellgehalt der Milchproben innerhalb von 48 Stunden nur geringfügig abnimmt.

Milchproben ohne NRS^{R} zeigten innerhalb der ersten 24 Stunden einen Anstieg der Meßwerte. Möglicherweise handelt es sich hier um ATP, das von zerfallenden Zellen freigesetzt wurde. Außerdem ist auch noch an eine ATP-Synthese zu denken, obwohl der lange Zeitraum dagegen spricht.

ZULAK, PATTON und HAMMERSTEDT (1976) inkubierten Milchproben über vier Stunden bei Zimmertemperatur. Einem Teil der Proben setzten sie Inhibitoren zu, die die Synthese von ATP verhindern und stellten dann einen sehr viel stärkeren Abfall des ATP-Gehaltes fest. Sie nehmen an, daß es sich hier um ATP handelt, das im Rahmen der Lipidsynthese entsteht, die man in frisch sezernierter Milch beobachten kann.

Untersucht man den Zusammenhang zwischen Lichtemission, ATP -Gehalt und Zellgehalt einer Milchprobe, treten einige Schwierigkeiten auf.

In destilliertem Wasser besteht eine lineare Beziehung zwischen ATP -Gehalt und Lichtemission. Die Intensität der Lumineszenz schwankt stark, wenn man bei gleichen ATP-Konzentrationen die Meßwerte verschiedener LUMIT^R - Chargen miteinander vergleicht. Außerdem ist es möglich, daß bei höheren Konzentrationen die Meßwerte nicht mehr linear ansteigen, d.h. es können nur kleine ATP-Mengen in einer Probe zuverlässig gemessen werden.

Das Absinken der Lumineszenz bei größeren Probenolumina entspricht den Angaben der Firma in der Gebrauchsanweisung zum Celltester M 1030. Die erhöhte Lumineszenz, wenn man die Lichtemission von 50 μ l ATP -Lösung + 50 μ l NRS^R mißt, läßt sich allerdings nicht erklären.

ATP in Milch zeigt eine lineare Beziehung zwischen der Intensität der Lichtemission und dem ATP -Gehalt.

Die Steigung der Standardgeraden ist sehr viel geringer als bei Aqua dest.-Lösungen.

Es wurde anfangs angenommen, daß die geringere Intensität der Lichtemission in erster Linie auf die optische Dichte der Milch zurückzuführen sei. Die Bestimmung des Fett- und Eiweißgehaltes einiger Milchproben bestätigte diese Vermutung nicht. Es ist also anzunehmen, daß auch der Einfluß von pH, Anionen und Kationen auf die Lumineszenz beträchtlich ist. Außerdem ist es durchaus möglich, daß es in einem so komplexen Medium wie Milch noch weitere Inhibitoren für die Luciferin - Luciferase-Reaktion vorhanden sind. Diese Möglichkeiten können auch dazu führen, daß verschiedene Milchproben bei Zusatz gleicher ATP-Konzentrationen eine unterschiedliche Lumineszenz zeigen.

Es ist immer notwendig, den ATP -Gehalt einer Probe mit Hilfe eines inneren Standards zu bestimmen. Die zugesetzte ATP-Menge sollte nicht zu gering gewählt werden, da niedrige ATP-Konzentrationen keine deutliche Intensitätsänderung der Lumineszenz hervorrufen. Die Verwendung eines inneren Standards hat den Vorteil, daß die die Lumineszenz hemmenden Faktoren gleichermaßen auf Probe und bekannte ATP-Konzentration wirken und so keinen Einfluß auf den errechneten ATP -Gehalt haben.

Die Bestimmung des inneren Standards hat auf der anderen Seite den Nachteil, daß dadurch pro Probe mindestens vier Messungen nötig werden, um Lichtemission und ATP -Gehalt feststellen zu können. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen machen es schwierig, genügend vergleichbare Werte

zu erhalten, wenn man die Korrelationen zwischen Lichtemission und Zellgehalt oder ATP -Gehalt feststellen will.

Auch mit kleinen Probenzahlen ergab sich immer eine statistisch gesicherte Beziehung zwischen Lichtemission und Zellgehalt einer Probe. Im besten Falle lag der Korrelationskoeffizient bei 0,88 und erreichte damit fast den von BOSSUYT (1978) für seine Untersuchungen angegebenen Wert von 0,91. Im schlechtesten Falle ($r = 0,69$) lag er in dem von WALSER, PRINZEN und BRUNNER angegebenen Bereich ($r = 0,67$).

Berücksichtigte man nur die Leukozytenzahlen der Proben, zeigten sie in zwei von drei Fällen eine geringere Korrelation mit der Lichtemission.

Eine Erklärung könnte darin gefunden werden, daß in der Milch nicht nur Epithelzellen, sondern auch verschiedene Blutzellen vorhanden sind. Es ist bekannt, daß die einzelnen Zellarten unterschiedliche ATP-Mengen enthalten. Außerdem dürfte der ATP-Gehalt einer Zelle noch von ihrem Alter und ihrer momentanen Stoffwechsellage abhängen.

Betrachtet man die Milch eutergesunder Kühe, findet man in ihr in erster Linie Epithelzellen, daneben polymorphkernige Leukozyten und Lymphozyten in geringer Zahl (SCHALM, CARROLL und JAIN 1971).

Mit Auftreten einer Mastitis wird das Spektrum der Zellen vielfältiger.

BOSSUYT verwendete für seine Untersuchungen nur ca. 20 Stunden alte gekühlte Tankmilch. Die obere Grenze

des Zellgehaltes lag bei etwa 1 200 000. Das heißt, er untersuchte in erster Linie Milch eutergesunder Kühe, in der nur wenige Zellarten in einer relativ konstanten Verteilung zu erwarten sind. Dadurch läßt sich die enge Beziehung erklären, die er für Lichtemission und Zellgehalt der Proben fand.

WALSER, PRINZEN und BRUNNER untersuchten auch Milchproben von Mastitis-Kühen, deren Zellgehalt bis zu 5 Millionen reichte. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Milchproben mit erhöhtem Zellgehalt untersucht. Hier lag die Obergrenze bei 13 Millionen Zellen / ml. In beiden Fällen sind alle Zelltypen zu erwarten, die in der Milch vorkommen können. Dabei ist es möglich, daß je nach Mastitissituation die eine oder andere Zellart in der Probe vorherrscht. Die ATP-Konzentrationen der einzelnen Proben lassen sich deshalb schlecht miteinander vergleichen, was sich im Korrelationskoeffizienten bemerkbar macht. Noch deutlicher wird der unterschiedliche ATP -Gehalt der einzelnen Proben, wenn man versucht, die Lichtemission und den ATP -Gehalt in Beziehung zu setzen. Hier dürfte die unterschiedliche Zusammensetzung der einzelnen Proben hinsichtlich Zelltyp und Alter der einzelnen Zellen dafür verantwortlich sein, daß zumindest für kleine Probenzahlen keine Beziehung zwischen Lichtemission und ATP - Gehalt einer Probe festzustellen ist.

Vergleicht man den ATP -Gehalt mit dem Zellgehalt, so ist auch hier bei kleinen Probenzahlen keine Korrelation vorhanden. Erst bei größerem Zahlenmaterial

besteht eine Beziehung. Der Korrelationskoeffizient $r = 0,59$ deutet auf die oben genannten Schwierigkeiten hin. Vergleicht man die Zellausstriche mit den Meßwerten der Lichtemission, fallen sogenannte "Ausreißer" auf. Das sind Milchproben mit einem hohen ATP -Gehalt bei niedriger Zellzahl und umgekehrt. Sie dürften Beispiele dafür sein, daß der ATP -Gehalt der Zellen von ihrem Alter und ihrer Stoffwechsellage abhängig ist. So kann es z.B. vorkommen, daß eine Schalm-positive Milch nur sehr kleine Meßwerte hat, im Ausstrich sind große Mengen degenerierender Zellen vorhanden. Das ATP scheint hier schon abgebaut zu sein, die Kerne liefern aber noch eine positive Schalmreaktion.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es möglich ist, mit diesem Verfahren wiederholbare Meßergebnisse zu erhalten. Außerdem besteht wahrscheinlich eine enge Beziehung zwischen Lichtemission und ATP -Gehalten bei zellarmer Milch. Man kann es sich durchaus vorstellen, daß dieses Verfahren z. B. zur Zellgehaltsbestimmung von Tankmilch eingesetzt werden kann, wenn es gelingt, LUMIT^R besser zu standardisieren, so daß mit großen Probenzahlen gearbeitet werden kann. Bei höheren Zellgehalten ist zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, von der Lichtemission auf den Zellgehalt einer Probe mit ausreichender Sicherheit zu schließen. Es ist höchstens eine Orientierung über den Zellgehalt möglich, wie sie zuverlässiger mit anderen Methoden durchzuführen ist.

5. Zusammenfassung:

In dieser Arbeit wird über eine Methode berichtet, mit der es möglich ist, ATP aus somatischen Zellen der Milch zu extrahieren.

Der ATP - Gehalt wird mit Hilfe der Biolumineszenz bestimmt. Das hier besprochene Verfahren ermöglicht bei geringem Arbeitsaufwand reproduzierbare Ergebnisse.

Es besteht eine lineare Beziehung zwischen der Lichtemission und dem Zellgehalt der Milchproben. Ebenso besteht eine Korrelation zwischen dem ATP-Gehalt und dem Zellgehalt der verschiedenen Proben. Das Verfahren erscheint geeignet, auf indirektem Wege den Zellgehalt zellarmer Milchproben zu ermitteln.

Summary:

The Somatic Cell Count in Milk by Bioluminescence Technique:

This paper describes a method which permits ATP extraction from the somatic cells of milk. ATP content is determined with bioluminescence technique. This procedure represents a simple device for repeatable measurements. It exists a fair correlation between light emission and the number of somatic cells in milk samples as well as the content of ATP and cells is correlated.

This method seems to be suitable for an indirect technique for evaluating the somatic cell content in milk with a low number of cells.

6. Literaturverzeichnis:

- ALEDORT, L.M.; WEED, R. and S. TROUP (1966): Ionic Effects on Firefly Luminescent Assay of RBC ATP. Anal. Biochem. 17, 268 - 277
- BEUTLER, E. and C.K. MATHAI (1967): A comparison of normal red cell ATP levels as measured by the Firefly Systems and the Hexokinase System. Blood 30, 311 - 320
- BOSSUYT, R. (1978): Usefulness of an ATP Assay Technique in Evaluating the Somatic Cell Content of Milk. Milchwissenschaft 33, 11 - 13
- BREWER, G.J. and C.A. KNUTSEN (1966): A Technique for the Processing of Blood Samples for Subsequent Assay of ATP and an Investigation of the Method of Standardization of the Firefly - Luciferase ATP Assay. Clin. Chim. Acta 14, 836 - 839
- BROOKS, D.E. (1970): Observations on the content of ATP and ADP in bull spermatozoa using the firefly luciferase system. J. Reprod. Fert. 23, 525 - 528
- COLE, H.A.; WIMPENNY, J.W.T. and D.E. HUGHES (1967): The ATP pool in E. coli. I. Measurements of the pool using a modified luciferase assay. Biochim. Biophys. Acta 143, 445 - 453

- DE LUCA, M. and W.D. Mc ELROY (1974): Kinetics of the Firefly Luciferase Catalyzed Reactions.
Biochemistry 13, 5, 922 - 925
- DENBURG, J.L. and W.D. Mc ELROY (1970): Anion Inhibition of Firefly Luciferase.
Arch. Biochem. Biophys. 141, 668 - 675
- D'EUSTACHIO, A.J. and G.V. LEVIN (1967): Levels of Adenosine Triphosphate during Bacterial Growth.
Bact. Proc. 67, 121
- D'EUSTACHIO, A.J. ; JOHNSON, D.R. and G.V. LEVIN (1968): Rapid Assay of Bacterial Populations.
Bact. Proc. 68, 13
- DUFRESNE, L. and H.J.GITELMAN (1970):
A semiautomated procedure for determination of Adenosine Triphosphate.
Anal. Biochem. 37, 402 - 408
- GILLES, R.; PEQUEUX, A.; SAIVE, J.J.; SPRONCK, A.C. and G. THOME - LENTZ (1976):
Effect of Various Ions on ATP Determinations Using the "Luciferin - Luciferase" System
Arch. internat. Physiol. Biochim. 84, 807 - 817
- GREEN, A.A.: and W.D.Mc ELROY (1956):
Crystalline Firefly Luciferase
Biochim. et Biophys. Acta 20, 170 - 176
- HARBER, M.J. and A.W. ASSCHER (1977):
A New Method for Antibiotic assay based on measurement of bacterial adenosine triphosphate using the firefly bioluminescence system
J. of Antimicrobial Chemotherapy 3, 35 - 41

HOLMSEN, H.; HOLMSEN, I. and BERNHARDSEN, A.(1966):

Microdetermination of Adenosine Diphosphate
and Adenosine Triphosphate in Plasma with the
Firefly Luciferase System.

Anal. Biochem. 17, 456 - 473

JOHNSON, R.A.; HARDMAN, J.G.: BROADUS, A.E. and E.W.
SUTHERLAND (1970):

Analysis of Adenosine 3', 5'-Monophosphate with
Luciferase Luminescence.

Anal. Biochem. 35, 91 - 97

KITCHEN, B.J.(1976):

Enzymic methods for estimation of the somatic
cell count in bovine milk

I Developement of assay techniques and study
of their usefulness in evaluating the somatic
cell content of milk.

J. Dairy Research 43, 251 - 258

LEIDL, W.; SCHALM, O.W. und P.LÜPS (1961):

Die Zellzahlbestimmung in der Milch nach
Prescott und Breed und ihre Fehlermöglich-
keiten.

Milchwissenschaft 16, 557 - 565

LIN, S. and COHEN, H.P. (1968):

Measurement of Adenosine Triphosphate Content
of Crayfish Stretch Receptor Cell Preparations.

Anal. Biochem. 24, 531 - 540

Mc ELROY, W.D. (1947):

Proc. nat. Acad. Sci. USA 33, 342

zitiert nach

LEHNINGER, A.L., Biochemie, Verlag Chemie,
Weinheim 1975

PHIPPS, L.W. and F.H.S. NEWBOULD (1966):

Determination of leucozyte concentrations in
cow's milk with a Coulter counter.

J. Dairy Research 33, 51 - 64

PRESCOTT, S.C. and R.S. BREED (1910):

The determination of the number of body
cells in milk by a direct method.

J. Inf. Dis. 7, 632

PRINZEN, R. (1977):

ATP-Bestimmungen (Adenosin-Triphosphat) mit
einer Schnellmethode an frischen und tiefge-
frorenen Bullenspermien.

Zuchthygiene, 12, 105 - 108

SCHALM, O. (1960):

Ein neuer Mastitis-Test.

Tierärztl. Umsch. 15, 151 - 153

SCHALM, O.W.; CARROLL, E.J.; JAIN, N.C. (1971):

Bovine Mastitis.

Lea & Febiger, Philadelphia

SCHMIDT MADSEN, P. (1975):

Fluoro-opto-electronic cell - counting on
milk.

J. Dairy Research 42, 227 - 239

STAHLHUT - KLIPP, H. (1973):

Beziehungen zwischen dem Gehalt an somatischen
Zellen und dem Laktosegehalt in Viertelgemelken.

Milchwissenschaft, 28, 766 - 768

STREHLER, B.L. and J.R. TOTTER (1952):

Firefly Luminescence in the study of energy transfer mechanisms

Arch. Biochem. Biophys. 40, 28 - 41

STREHLER, B.L. and J.R. TOTTER (1956):

in: D. GLICK (ed.)

Methods of Biochemical Analysis. Vol. 1

Interscience, New York, 341 - 346

THORE, A.; NILSSON, L.; HÖJER, H.; ÅNSEHN, S.
and L. BRÖTE (1977):

Effects of Ampicillin on Intracellular Levels of Adenosine Triphosphate in bacterial Cultures related to Antibiotic Susceptibility.

Acta path. microbiol. scand. Sect. B 85, 161 - 166

WALSER, K.; PRINZEN, R. und C. BRUNNER (1978):

Erste Ergebnisse der Zellgehaltsbestimmung in Milch durch ATP-Messung nach dem Biolumineszenzverfahren.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 373 - 375

WESTHOFF, D. C. and T. ENGLER (1975):

Detection of penicillin in milk by bioluminescence.

J. Milk Fd. Technol. 38, 537 - 539

ZEIDLER, H.; TOLLE, A. und HEESCHEN, N. (1968):

Verbesserte Präparationstechnik zur elektronischen Bestimmung des Zellgehaltes in Milch.

Milchwissenschaft 23, 564 - 568

ZULAK, I.M.; PATTON, S. and R.H. HAMMERSTEDT (1956):

Adenosine Triphosphate in Milk.

J. Dairy Sci. 56, 1388 - 1391

Anhang:

Tabelle 1: Reaktionsverlauf von 4 Milchproben
je 2x gemessen

Zeit (Sek.)	Probe 1		2		3		4	
2,4	5,5	3,9	5,2	9,2	6,5	6,2	21,7	21,9
4,8	6,1	4,3	5,8	10,5	7,1	7,0	27,4	24,6
7,2	6,3	4,6	5,6	11,1	7,4	7,3	28,2	25,8
9,6	6,5	4,7	5,9	11,3	7,6	7,5	27,7	26,3
12,0	6,6	4,9	5,9	11,5	7,7	7,6	28,9	26,6
14,4	6,7	5,0	6,4	11,6	7,8	7,8	29,1	26,7
16,8	6,8	5,1	6,7	11,6	7,9	7,8	29,2	26,9
19,2	6,8	5,2	6,6	11,6	7,9	7,9	29,2	27,1
21,6	6,8	5,3	6,9	11,6	7,8	8,0	29,3	27,2
24,0	6,9	5,4	7,0	11,7	8,0	8,0	29,4	27,4
26,4	6,9	5,5	7,6	11,8	8,0	8,1	29,4	27,2
28,8	7,0	5,5	7,6	11,9	8,0	8,1	29,5	28,0
31,2	7,0	5,6	7,8	12,0	8,0	8,1	29,6	28,0
33,6	6,9	5,7	7,9	12,1	8,0	8,1	29,7	28,7
36,0	7,0	5,7	8,1	12,3	8,0	8,1	29,8	29,1
38,4	7,0	5,8	8,3	12,5	8,1	8,1	29,9	29,5
40,8	7,0	5,8	8,5	12,7	8,0	8,1	30,0	29,8
43,2	7,0	5,9	8,8	13,0	8,1	8,2	30,0	30,2
45,6	7,0	5,9	9,1	13,3	8,0	8,2	30,0	30,5
48,0	7,0	6,0	9,4	13,7	8,0	8,2	30,1	30,7
50,4	7,0	6,0	9,7	14,0	8,0	8,2	30,1	30,9
52,8	7,0	6,0	10,0	14,4	8,0	8,2	30,0	31,0
55,2	7,0	6,0	10,3	14,7	8,0	8,1	30,0	31,0
57,6	7,0	6,0	10,6	15,1	8,0	8,1	29,9	30,9
60,0	7,0	6,1	11,0	15,5	8,1	8,1	29,9	30,8
62,4	7,0	6,1	11,3	15,9	8,0	8,1	29,9	30,7
64,8	7,0	6,1	11,6	16,3	8,0	8,2	29,9	30,7
67,2	7,0	6,1	11,9	16,6	8,0	8,1	29,8	30,6
69,6	7,0	6,1	12,1	17,0	8,0	8,1	29,8	30,5
72,0	7,0	6,1	12,4	17,3	8,0	8,1	29,6	30,2
74,4	7,0	6,1	12,6	17,6	8,0	8,1	29,6	30,1
76,8	7,0	6,1	12,8	17,9	8,0	8,1	29,6	29,9
79,2	7,0	6,1	13,1	18,2	7,9	8,1	29,4	29,8
81,6	7,0	6,1	13,2	18,4	8,0	8,1	29,2	29,6
84,0	7,0	6,1	13,4	18,6	8,0	8,0	29,0	29,6
86,4	7,0	6,1	13,5	18,9	7,9	8,0	28,9	29,6
88,8	6,9	6,1	13,6	19,1	7,9	8,0	28,8	29,5
91,2	6,9	6,0	13,7	19,2	7,9	8,0	28,6	29,2
93,6	6,9	6,0	13,8	19,3	7,9	8,0	28,5	29,1
96,0	6,9	6,0	13,9	19,5	7,9	8,0	28,2	29,0
98,4	6,9	6,0	13,9	19,6	7,9	8,0	28,0	29,0
100,8	6,9	6,0	14,0	19,7	7,9	8,0	27,9	28,8
103,2	6,9	6,0	14,0	19,8	7,9	7,9	27,8	28,7
105,6	6,9	6,0	14,0	19,9	7,8	7,9	27,7	28,6
108,0	6,8	6,0	14,0	19,9	7,8	7,9	27,7	28,5
110,4	6,8	5,9	14,0	20,0	7,8	7,9	27,6	28,3
112,8	6,8	5,9	14,0	20,0	7,8	7,9	27,5	28,3
115,2	6,8	5,9	13,9	20,0	7,8	7,9	27,3	28,2
117,6	6,8	5,9	13,9	20,0	7,8	7,9	27,2	28,0
120,0	6,8	5,9	13,9	20,1	7,8	7,9	27,1	27,9

Tabelle 2: Reaktionsverlauf von 6 Milchproben

Zeit (Sek.)	Probe 5	6	7	8	9	10
2,4	13,4	0,42	3,8	0,1	2,4	1,0
4,8	16,4	0,47	4,2	0,6	2,7	6,1
7,2	18,1	0,50	4,4	0,7	3,0	6,4
9,6	19,3	0,51	4,6	0,7	3,2	6,6
12,0	20,0	0,53	4,6	0,7	3,4	6,7
14,4	20,5	0,53	4,7	0,8	3,6	6,8
16,8	20,9	0,54	4,8	0,8	3,8	6,9
19,2	21,2	0,54	4,9	0,8	3,9	7,0
21,6	21,3	0,55	4,9	0,8	4,1	7,0
24,0	21,5	0,57	5,0	0,8	4,2	7,1
26,4	21,7	0,56	5,1	0,8	4,3	7,1
28,8	21,8	0,57	5,2	0,8	4,4	7,1
31,2	21,9	0,56	5,3	0,8	4,6	7,2
33,6	22,1	0,60	5,4	0,8	4,8	7,2
36,0	22,2	0,59	5,5	0,8	4,9	7,2
38,4	22,4	0,61	5,7	0,8	5,0	7,2
40,8	22,6	0,60	5,8	0,8	5,1	7,2
43,2	22,8	0,61	5,9	0,8	5,1	7,2
45,6	23,0	0,59	6,0	0,8	5,3	7,2
48,0	23,2	0,59	6,1	0,8	5,3	7,2
50,4	23,4	0,61	6,2	0,8	5,4	7,3
52,8	23,5	0,61	6,3	0,8	5,4	7,3
55,2	23,7	0,62	6,4	0,9	5,5	7,3
57,6	23,8	0,63	6,4	0,8	5,6	7,3
60,0	23,9	0,62	6,5	0,8	5,6	7,3
62,4	24,0	0,65	6,5	0,7	5,6	7,2
64,8	24,1	0,65	6,6	0,7	5,7	7,2
67,2	24,1	0,64	6,6	0,7	5,7	7,2
69,6	24,2	0,65	6,7	0,7	5,7	7,2
72,0	24,2	0,66	6,7	0,8	5,8	7,2
74,4	24,2	0,65	6,7	0,7	5,8	7,2
76,8	24,1	0,65	6,8	0,7	5,8	7,1
79,2	24,1	0,60	6,8	0,7	5,8	7,1
81,6	24,1	0,65	6,8	0,7	5,8	7,1
84,0	24,0	0,63	6,8	0,7	5,8	7,1
86,4	24,0	0,67	6,8	0,7	5,8	7,1
88,8	23,9	0,66	6,8	0,7	5,9	7,1
91,2	23,8	0,68	6,8	0,7	5,9	7,1
93,6	23,7	0,63	6,8	0,7	5,9	7,1
96,0	23,6	0,67	6,9	0,7	5,9	7,0
98,4	23,5	0,69	6,9	0,7	5,9	7,1
100,8	23,3	0,67	6,8	0,7	5,9	7,1
103,2	23,2	0,66	6,8	0,7	5,9	7,1
105,6	23,1	0,68	6,8	0,7	5,8	7,0
108,0	22,8	0,67	6,8	0,7	5,8	7,0
110,4	22,7	0,66	6,8	0,7	5,8	7,0
112,8	22,6	0,67	6,8	0,7	5,8	7,0
115,2	22,5	0,66	6,8	0,7	5,8	7,0
117,6	22,4	0,68	6,8	0,7	5,8	7,0
120,0	22,3	0,67	6,7	0,7	5,8	7,0

+79 Sek.
bis Max.

Tabelle 3: Reaktionsverlauf von Milchproben mit
und ohne ATP - Zusatz
(Legende s.nächste Seite)

Zeit (Sek.)	ATP	1	2	2 a	3	3 a
2,4	25,3	11,4	7,1	6,9	13,4	9,8
4,8	25,2	13,0	7,9	7,7	14,8	10,7
7,2	25,1	13,7	8,2	8,1	15,5	11,1
9,6	24,9	13,9	8,4	8,4	15,9	11,4
12,0	24,8	14,0	8,5	8,6	16,1	11,5
14,4	24,6	14,1	8,6	8,8	16,2	11,5
16,8	24,5	14,1	8,7	8,9	16,3	11,5
19,2	24,3	14,0	8,8	9,0	16,3	11,5
21,6	24,2	14,0	8,8	9,1	16,3	11,4
24,0	24,0	14,0	8,9	9,2	16,2	11,4
26,4	23,9	13,9	8,9	9,3	16,1	11,4
28,8	23,7	13,9	9,0	9,4	16,0	11,3
31,2	23,6	13,8	9,1	9,5	15,9	11,2
33,6	23,4	13,7	9,2	9,6	15,8	11,1
36,0	23,1	13,7	9,3	9,7	15,8	11,0
38,4	23,0	13,7	9,4	9,8	15,8	10,9
40,8	22,8	13,6	9,5	9,9	15,7	10,8
43,2	22,5	13,5	9,5	10,0	15,6	10,7
45,6	22,4	13,5	9,6	10,0	15,5	10,6
48,0	22,2	13,4	9,6	10,1	15,4	10,5
50,4	22,0	13,4	9,7	10,1	15,3	10,2
52,8	21,8	13,3	9,8	10,2	15,2	10,1
55,2	21,7	13,3	9,8	10,2	15,1	10,0
57,6	21,5	13,2	9,8	10,3	14,9	9,9
60,0	21,4	13,2	9,8	10,3	14,8	9,8
62,4	21,2	13,1	9,9	10,3	14,7	9,7
64,8	21,0	13,1	9,9	10,3	14,6	9,5
67,2	20,8	13,0	9,9	10,3	14,4	9,4
69,6	20,7	12,9	9,8	10,5	14,2	9,3
72,0	20,5	12,9	9,8	10,5	14,1	9,2
74,4	20,4	12,8	9,8	10,6	14,0	9,1
76,8	20,3	12,7	9,8	10,6	13,9	9,0
79,2	20,1	12,7	9,8	10,6	13,8	8,8
81,6	20,0	12,6	9,7	10,6	13,7	8,7
84,0	19,9	12,6	9,7	10,6	13,6	8,6
86,4	19,7	12,5	9,7	10,6	13,5	8,5
88,8	19,6	12,5	9,7	10,6	13,4	8,4
91,2	19,4	12,4	9,6	10,6	13,3	8,4
93,6	19,1	12,3	9,6	10,6	13,2	8,2
96,0	19,0	12,3	9,6	10,5	13,1	8,1
98,4	18,7	12,2	9,5	10,5	13,0	8,0
100,8	18,6	12,3	9,5	10,5	12,9	7,9
103,2	18,5	12,1	9,5	10,4	12,7	7,8
105,6	18,3	12,1	9,5	10,4	12,6	7,6
108,0	18,1	12,0	9,4	10,4	12,4	7,5
110,4	17,9	12,0	9,4	10,4	12,3	7,4
112,8	17,6	11,9	9,4	10,3	12,2	7,3
115,2	17,4	11,9	9,3	10,3	12,1	7,2
117,6	17,2	11,8	9,3	10,3	12,0	7,1
120,0	17,1	11,8	9,3	10,2	11,9	7,0

Legende zu Tabelle 3:

- ATP = 20 ng ATP in 50 μ l Aqua dest.
1 = 50 μ l Milch Probe 2 + 50 μ l NRS^R
60 sek nach Ansatz gemessen
2+2a = 50 μ l Milch Probe 1 + 50 μ l NRS^R + 10 ng ATP
sofort nach Ansatz gemessen
3+3a = 50 μ l Milch Probe 1 + 50 μ l NRS^R
60 sek nach Ansatz Zugabe von 10 ng ATP
und Messung der Lumineszenz

Tabelle 4: Vergleich der über 5 , 10 und 40 sek integrierten Werte mit den Maxima der alle 2,4sek gemessenen Werte:

5 sek	10 sek	40 sek	Maximum (2,4sek)
0,7	1,3	6,8	1,7
0,2	0,2	1,2	0,3
0,5	1,2	6,4	1,5
9,3	23,9	70,7	24,2
1,7	3,0	15,4	3,3

Tabelle 5: Wiederholbarkeit der Meßergebnisse
bei je 10x gemessenen Milchproben

Messung	Probe				
	1	2	3	4	5
1	19,0	47	1,80	11,1	20,9
2	17,7	50	1,77	11,2	23,5
3	17,9	45	2,10	9,4	14,6
4	19,2	46	2,07	8,7	21,8
5	18,5	47	1,74	12,3	28,5
6	19,1	44	1,62	10,6	16,4
7	19,7	43	1,95	10,7	21,1
8	19,2	45	1,85	7,9	20,5
9	18,5	43	1,90	10,6	21,0
10	20,0	45	2,08	12,3	19,3
$\bar{x}$	18,89	45,5	1,88	10,48	20,76
$S \pm$	0,736	2,212	0,162	1,437	3,914
VK %	3,89	4,66	8,57	13,72	18,85

Tabelle 6: Wiederholbarkeit der Meßergebnisse
bei je 5x gemessenen Milchproben

Messung	Probe				
	1	2	3	4	5
1	1,2	1,2	0,41	18,7	3,2
2	1,0	0,8	0,47	18,1	3,4
3	1,1	0,8	0,40	19,5	4,1
4	1,3	0,7	0,45	24,4	2,2
5	1,3	0,8	0,51	20,3	3,4
$\bar{x}$	1,18	0,86	0,45	20,2	3,26
$S \pm$	0,130	0,195	0,054	2,490	0,684
VK %	1,10	2,27	10,03	12,33	20,98

Tabelle 7: Wiederholbarkeit der Meßergebnisse

Verteilung der Variationskoeffizienten

	VK %	5	5-10	10-15	15-20	20
25 Milchproben mit je 10 Messungen		5	5	5	5	4
50 Milchproben mit je 5 Messungen		6	18	14	7	5
5 ATP-Lösungen mit je 5 Messungen		4	4	1	1	-

Tabelle 8: Änderung der Lichtemission innerhalb von48 Stunden bei Milchproben mit (a) und ohne (b)
NRS^R-Zusatz (Lagerung bei 4°C)

Zeit nach Probennahme	Milchprobe: (gemessene Lichtemission)							
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b
0 Std.	0,96	0,20	0,83	0,13	0,48	0,14	0,91	0,11
24 Std.	0,65	0,22	0,62	0,23	0,40	0,21	0,72	0,20
48 Std.	0,43	0,16	0,49	0,17	0,28	0,20	0,45	0,24

Tabelle 9: Meßwerte verschiedener Milchproben mit und
ohne NRS^R

50	1 Milch	100	1 Milch	50 μ l Milch + 50 μ l Aqua dest.	50 μ l Milch + 50 μ l NRS
	0,2	0,2		0,2	2,6 2,3
	0,3	0,2		0,6	30 34
	0,3	0,4		0,5	7,2 9,3
	0,1	0,3		0,4	14 17
	0,8	0,1		1,4	83 88
	0,3	0,1		0,6	37 41

Tabelle 10: Beziehungen zwischen Lichtemission
und Leukozytengehalt bzw. Gesamt-
zellgehalt von Milchproben

K o r r e l a t i o n e n

Probenzahlen	Imp./Leukozytengeh.	Imp./Ges.Zellzahl
n = 12	r = 0,83 *** y = -0,97 + 0,01x	r = 0,76 ** y = -0,31 + 0,008x
n = 18	r = 0,78 *** y = 1,36 + 0,02x	r = 0,83 *** y = 1,89 + 0,01 x
n = 22	r = 0,59 ** y = 1,68 + x	r = 0,69 *** y = 0,91 + 0,01 x

** p < 0,01

*** p < 0,001

Lebenslauf:

Maria Claudia Brunner	geb. am 24.Mai 1947 in München
Eltern:	Dr. Heinrich Brunner und Marta Brunner, geb.Wiedermann
1953 - 1957	Volksschule in Mannheim
1957 - 1966	Karl-Friedrich-Gymnasium, Mannheim
1966 - 1972	Biologie-Studium an der Universität in Freiburg/Breisgau mit Abschluß als Diplombiologe
1972 - 1977	Studium der Tiermedizin an der Universität München; Staatsexamen Dezember 1977
Februar 1978	Approbation als Tierarzt
Januar 1979	Niederlassung als praktischer Tierarzt; Gemeinschaftspraxis mit Dr. M. Zuber in Geretsried

